

Le terme «pouvoir insecticide» ne correspond pas à un mécanisme biologique clairement défini; il comprend un grand nombre de réactions biologiques et toxicologiques qui nous échappent pour des raisons techniques. Ces faits compliquent l'étude des relations entre la constitution chimique et le pouvoir insecticide.

Légende de la tablelle.

Action insecticide: \emptyset = aucune action.
 + à + + + = plus ou moins forte action.
 Insectes examinés: Pou = Pediculi vestimenti,
 Mouche: Calliphora vomitoria,
 Fourmi: Formica fusca,
 Charançon: Calandra granaria,
 Pyrale: Ephestia Kugniella,
 Mite: Larves de Tineola biselliella.

Laboratoires de recherches, *J. R. Geigy, A.G.*, Bâle.

169. Progrès récents dans la biochimie de la choline et de ses dérivés

par **Ernest Kahane¹⁾** et **Jeanne Lévy²⁾**.

(12 VI 46)

Les travaux que nous avons consacrés à la biochimie de la choline et de ses dérivés appartiennent aux trois groupes suivants:

- 1^o Etude de la présence et de l'état de la choline chez les êtres vivants;
- 2^o Etude de la présence de l'acétylcholine libre ou dissimulée chez les êtres vivants;
- 3^o Pharmacologie de l'acétylcholine et des substances qui lui sont apparentées.

Nous décrirons dans ce travail l'évolution de nos recherches sur la présence et sur l'état de la choline dans les substances biologiques, qui nous ont amenés à établir plusieurs techniques analytiques nouvelles.

Si la présence de la choline à l'état combiné, sous la forme de lécithine, est depuis longtemps universellement reconnue dans toutes les cellules vivantes, son existence à l'état libre était loin d'être établie avec certitude. La polémique qui a mis aux prises entre 1907 et 1910 *Gautrelet* et *Blanchetière* au sujet de la choline libre du sang, est parti-

¹⁾ Maître de Conférences à l'Ecole Nationale d'agriculture de Grignon, Directeur du laboratoire de Microanalyse Organique du Centre National de la Recherche Scientifique.

²⁾ Professeur à la Faculté de Médecine de Paris, Directeur du laboratoire de Contrôle des Médicaments antivénéériens de l'Académie de Médecine de Paris.

culièrement significative à cet égard. Une substance biologique avait cependant été l'objet de nombreux travaux qui étaient tous concordants: c'est le sperme, dont la richesse en choline était même le principe de sa recherche médico-légale par la réaction de *Florence* (précipitation caractéristique de l'ennéaiodure de choline).

En vertu de cette propriété, *Rondeau du Noyer* et *Kahane* ont essayé d'établir en 1933 une méthode d'identification de la poudre de testicules, par la formation des cristaux de *Florence* au moyen d'un réactif iodo-ioduré. En fait, cette réaction était fortement positive, non seulement avec la poudre de testicules, mais également avec toutes les autres poudres opothérapiques soumises à l'expérience. Ce résultat, qui interdisait l'application analytique projetée, était en contradiction avec ce que l'on savait du caractère aléatoire de la recherche de la choline dans les organes animaux.

Les techniques analytiques dont on disposait à cette époque ne permettaient pas d'aller beaucoup plus loin, car la choline possède peu de réactions caractéristiques. Elle précipite avec les réactifs généraux des alcaloïdes en même temps qu'un grand nombre parmi les substances azotées des extraits animaux et végétaux. La réaction biologique, après acétylation, si elle est spécifique de la choline, peut intéresser dans une mesure plus ou moins grande la choline engagée dans ses combinaisons. De plus, le simple problème de la séparation de la choline libre et des lécithines était mal résolu. Il nous a fallu établir des techniques plus sûres que les méthodes générales classiques et nous avons été assez heureux pour trouver dans l'hydroxyde de fer naissant, employé sous la forme du mélange d'une solution de sulfate de fer(III) et de carbonate de calcium, un réactif qui fournit des extraits aqueux remarquablement purs et fidèles.

Même dans ces extraits, la choline est loin d'être la seule substance qui précipite par les réactifs généraux des alcaloïdes et notamment par le réactif iodo-ioduré. Néanmoins, à condition d'opérer en milieu très dilué, la réaction de *Florence* apparaît généralement avec netteté. Un dosage approximatif peut être fait en observant la dilution limite de disparition de la réaction de *Florence* par comparaison avec une solution-témoin.

Nous avons appliqué cette méthode à de nombreux tissus. En faisant le broyage et la défécation aussi rapidement que possible après le prélèvement, de façon à éviter toute altération de la choline primitivement présente ou toute apparition de choline aux dépens de ses formes complexes, nous avons reconnu que la quasi-totalité des substances biologiques renferment de la choline à l'état libre, en quantité extrêmement variable de l'une à l'autre, mais avec une certaine régularité pour des échantillons différents du même tissu appartenant à la même espèce.

Mais le phénomène antérieurement décrit n'était pas suffisamment expliqué par la présence ainsi reconnue de choline libre dans tous les organes. Non seulement la quantité de choline libre de l'intestin (10—60 γ par g), du foie (5—120), des poumons (5—75), des reins (5—90), etc., est relativement faible, mais celle que l'on trouve dans les testicules (5—60), les vésicules séminales (10—175) et le sperme (70) l'est également. Après le paradoxe de la choline libre abondante dans toutes les poudres d'organes, nous tombons sur le paradoxe de la choline libre rare même dans les substances biologiques traditionnellement réputées en contenir beaucoup.

L'étude particulière du sperme et des organes génitaux mâles nous a montré que l'abondance de la choline libre est sous l'étroite dépendance du temps qui s'écoule entre le prélèvement et la préparation de l'extrait. Un énorme supplément de choline libre apparaît rapidement dans ces différents tissus, et surtout dans le sperme (2,12 mg après 6 h.). L'idée d'un processus enzymatique s'imposait, et elle a été confirmée par l'observation du pouvoir enzymatique intense des extraits de prostate vis-à-vis des extraits de vésicules séminales.

Quel était le substrat aux dépens duquel se faisait la libération de choline? La défécation par l'hydroxyde de fer(III) naissant permet de séparer les principes franchement hydrosolubles des principes insolubles ou existant à l'état colloïdal. Il fut facile de reconnaître que ce n'est pas aux dépens de ceux-ci que se fait la libération de choline, mais par action de l'extrait de prostate sur le liquide provenant de la défécation.

A côté de la choline libre que nous avons rencontrée dans les extraits aqueux des tissus, ceux-ci renferment donc une *forme combinée* de la choline capable de libérer cette substance sous une influence enzymatique. La même libération a lieu par hydrolyse, notamment sous l'influence de l'acide chlorhydrique à l'ébullition. Cette forme de choline, que nous désignons provisoirement sous le nom de «Choline hydrosoluble combinée», n'est pas particulière au sperme, mais existe dans la majeure partie des tissus animaux et végétaux. Son abondance est variable, mais la quantité de choline qu'elle fournit par hydrolyse est généralement supérieure à la choline libre. Dans certains cas, elle est considérable, comme pour les vésicules séminales (0,5 à 2,3 mg par g) et le sperme (2,8 mg). Chez la plupart des organes animaux, on en trouve de 0,05 à 0,2 mg par g.

Ces tissus étaient peu utilisables pour une recherche systématique en vue de l'identification de la «choline hydrosoluble combinée», les uns parce qu'ils sont peu accessibles, les autres parce qu'ils sont trop pauvres. Nous avons procédé à une enquête afin de trouver une matière première à la fois abondante et riche en choline hydrosoluble combinée. Au cours d'un séjour à la Station Zoologique de Roscoff,

nous avons eu la bonne fortune de trouver dans un mollusque, la Patelle (*Patella vulgata*), la source que nous recherchions. La Patelle contient en effet par gramme environ 0,1 mg de choline libre et 0,4 à 2,5 mgr. de choline à l'état hydrosoluble combiné.

Nous avons traité 76 kg de patelles afin d'en extraire le principe en question, d'étudier ses propriétés et d'établir sa composition. La choline hydrosoluble combinée ne présente aucune des réactions de précipitation par les réactifs généraux des alcaloïdes. Mais comme elle est soluble dans les alcools et dans l'eau, et insoluble dans l'acétone, nous avons effectué une série de précipitations par ce dernier réactif qui ont largement purifié l'extrait primitif provenant de la défécation ferrique. Le rapport du produit sec au chlorure de choline qu'il donne par hydrolyse était passé de 70 à 11. Nous avons alors poussé plus loin la purification de notre extrait par adsorption de la choline hydrosoluble combinée en solution dans l'alcool méthylique sur le silicagel. L'éluion était faite par action de l'eau bouillante, et fournissait un extrait contenant environ un tiers de son poids de chlorure de choline.

C'est sur ces entrefaites que nos recherches ont été interrompues par la guerre, puis entravées par l'occupation. Nous les avons reprises avec activité dès la Libération qui nous a permis de reconstituer nos équipes de travail. Mais presque tous nos extraits s'étaient hydrolysés dans l'intervalle et étaient devenus inutilisables. Les côtes étaient inaccessibles et la récolte des Patelles à peu près impossible.

Aussi, en attendant de reprendre l'étude des extraits de Patelle, nous avons pensé à utiliser un matériel plus simple. En effet, nous avons effectué des recherches sur l'autolyse des organes, comme suite à nos observations sur l'action de l'enzyme de la prostate sur les extraits de vésicules séminales. En raison de la libération progressive de choline par l'intestin maintenu en survie, libération bien connue à laquelle on avait même attribué un caractère hormonal, nous avons étudié d'une façon particulièrement approfondie l'évolution des substances choliniques de l'intestin intact ou broyé. Nous avons ainsi reconnu que le stock de choline hydrosoluble combinée et celui de choline libre croissent au détriment de la choline non hydrosoluble, la totalité de la choline, ou presque, finissant par se trouver à l'état libre. Cette dégradation paraît être due à un mécanisme en deux étapes: hydrolyse enzymatique des phospho-aminolipides en choline hydrosoluble combinée, hydrolyse enzymatique de celle-ci en choline libre. Nous avons pu définir les conditions expérimentales dans lesquelles le premier mécanisme se produit presque exclusivement et nous avons reconnu qu'il permet la dégradation des lécithines isolées.

Opérant sur une suspension de lécithine de l'œuf dans l'eau, nous avons obtenu par l'action de l'intestin broyé une solution renfermant, après défécation, une portion importante de la choline primitive sous forme combinée. Nous avons appliqué à ces extraits les méthodes de précipitation à l'acétone et d'adsorption sur silicagel qui avaient permis de purifier les extraits de Patelle. Comme nous partions d'un

milieu plus simple et plus riche, nous avons obtenu plus facilement des extraits plus purs. Le produit final s'est montré en effet rebelle à toutes les tentatives de séparation auxquelles nous l'avons soumis. Il contient environ la moitié de son poids de choline (comptée en chlorure) et renferme, pour une molécule de choline, une molécule d'acide glycérophosphorique. Au moins dans ce cas particulier, la choline hydrosoluble combinée s'identifie par conséquent à l'*ester glycérophosphorique de la choline*.

Nous ne pouvons pas généraliser entièrement ce résultat et nous continuerons à désigner sous le nom de *choline hydrosoluble combinée* le principe que nous avons rencontré dans la plupart des tissus animaux et végétaux. Certaines observations nous font penser que ce principe n'est pas toujours identique à lui-même et qu'il s'agit sans doute de toute une *classe d'esters* dont la glycérophosphoryl-choline n'est que l'un des représentants.

Pour toutes ces recherches nous avons eu besoin de connaître avec le maximum de précision la teneur en choline libre et en choline totale des substances sur lesquelles nous travaillions. Les méthodes de dosage par appréciation de la dilution limite de la réaction de *Florence*, ou biologique après acétylation, ne permettaient qu'une évaluation approximative. Nous nous sommes attachés à mettre au point une technique plus précise et nous avons réussi à adapter le dosage volumétrique de l'iode du periodure de choline aux extraits biologiques.

En fait, cette méthode est fréquemment utilisée, mais ne donne de bons résultats que sur les extraits contenant peu de substances étrangères à côté de la choline elle-même, car la plupart des bases de l'organisme donnent en milieu concentré des précipités avec le réactif iodo-ioduré. La séparation de la choline et de ces bases est difficile et les méthodes par précipitation, qu'elles fassent appel à ce réactif, au sel de *Reinecke*, à l'acide phosphotungstique, etc., ne conviennent qu'aux extraits lipidiques. La préparation de ces derniers extraits offre elle-même des difficultés notables, car il est pratiquement impossible d'extraire d'un tissu la totalité de sa choline au moyen des solvants organiques. Le dosage de la choline totale doit être fait sur le tissu total, et nous avons successivement décrit une méthode d'attaque sulfurique, puis une méthode d'attaque nitrique, au cours desquelles la choline se trouve libérée de ses combinaisons. Beaucoup de substances azotées sont détruites au cours de ces attaques acides et dans le deuxième procédé, la choline reste seule à précipiter par le réactif iodo-ioduré.

La technique que nous préconisons (en collaboration avec *G. Ducet*), consiste par conséquent à attaquer la substance biologique par l'acide nitrique au tiers, à neutraliser par un excès de carbonate de calcium, à déféquer par addition de sulfate de fer(III), à précipiter le periodure de choline par un réactif iodo-ioduré et enfin à titrer au thiosulfate

8 des 9 atomes d'iode de ce periodure. Nous obtenons ainsi des résultats reproductibles. De plus, le periodure de choline isolé peut servir à l'identification de la choline par transformation en phosphotungstate et étude des propriétés de ce sel.

Nous employons cette méthode, qui offre le maximum de garantie, pour éclaircir le problème du métabolisme de la choline qui est fort mal connu, dans l'espoir de jeter quelque lumière sur ce que l'on soupçonne du rôle physiologique de la choline, de la choline hydro-soluble combinée et des phosphoaminolipides.

Paris, Laboratoire de microanalyse organique du C. N. R. S.
Laboratoire de Contrôle des Médicaments antivénériens
de l'Académie de Médecine.

BIBLIOGRAPHIE.

Bl. Soc. Chim. biol. **15**, 938—943 (1933); **18**, 479—489; 490—504; 505—528; 529 à 555 (1936); **19**, 205—233; id. 777—786; id. 959—975; id. 976—989 (1937); **21**, 223—240; id. 241—249; id. 250—255; id. 256—263; id. 1055 (1939); **27**, 65—72; id. 72—77; id. 164—167; id. 167—171; id. 171—180; id. 346—353; id. 354—357; id. 544—553; id. 553—562; id. 562—570 (1945).

Monographies publiées par *Hermann & Cie.*, Paris: Biochimie de la choline et de ses dérivés: I. Choline-Neurine. II. Acétylcholine. III. Colamine, triméthylamine et substances diverses. VI. Dosages biologiques (1938).

Thèse Pharmacien Supérieur, *Pédron*, Paris, 1944.

C. r. **191**, 1130 (1930); **202**, 781; id. 1210; id. 2186 (1936); **204**, 1752 (1937); **207**, 642; id. 747 (1938); **219**, 431 (1944); **220**, 97 (1945).

Bl. [4] **49**, 557—567 (1931); [5] **3**, 621—626; id. 1588—1595 (1936); [5] **4**, 717—727 (1937); [5] **6**, 647—655 (1939).

C. r. Soc. Biol. **99**, 1136 (1928); **101**, 909 (1929); **121**, 1896 (1936); **125**, 252 (1937); **127**, 10 (1938); **130**, 309; id. 312; id. 316 (1939).

J. Pharm. Chim. **12**, 220—228 (1930); **13**, 371—385 (1931); **15**, 49—60 (1932); **22**, 254—267 (1935).

C. r. Journ. méd. pharm. Franco-belges, Lille, **1934**, 155—162; Arch. Physiol. Path. Gén. **35**, 389—406 (1937); Arch. intern. Pharm. Thérap. **57**, 467—488 (1937); Sech. J. Physiol., U.S.S.R. **21**, 383 (1938); Ann. Physiol. **14**, 575—581 (1938); C. r. XIIe Congrès Assoc. Physiol. Langue Franç., Louvain, **1938**, 114; C. r. XIIIe Congrès, **1939**, 397; Le Lait **25**, 193—223 (1945).

170. Recherches récentes dans le domaine des hormones en Suisse

par K. Miescher.

(17 VI 46)

Paraîtra ailleurs ¹⁾.

¹⁾ Exper. **2**, 237 (1946).